

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/73, 15/10, A61K 39/02		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/07874 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Februar 1998 (26.02.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04560		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. August 1997 (21.08.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 33 698.8 21. August 1996 (21.08.96) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: LUBITZ, Werner [AT/AT]; Schönborngasse 12/7, A-1080 Wien (AT).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JECHLINGER, Wolfgang [AT/AT]; Strozzigasse 38/12, A-1080 Wien (AT). SZOSTAK, Michael [AT/AT]; In den Schnablern 9/3, A-2344 Maria Enzersdorf (AT).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

(54) Title: NEW SYSTEMS FOR REGULATING GENETIC EXPRESSION**(54) Bezeichnung:** NEUE SYSTEME ZUR REGULATION DER GENEXPRESSSION**(57) Abstract**

The present invention concerns a process for selecting new PR- or PL-operator sequences of lambdoid phages which, compared to wild-type sequences, have a different thermostability for the binding of a repressor. In addition, the invention discloses new mutated PR- or PL- operator sequences and their use for temperature-regulated expression of genes and for producing improved vaccines.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion neuer PR- oder PL-Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen. Weiterhin werden neue mutierte PR- oder PL-Operatorsequenzen sowie deren Verwendung zur temperaturregulierten Expression von Genen und zur Herstellung verbesserter Impfstoffe offenbart.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Neue Systeme zur Regulation der Genexpression**Beschreibung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion neuer P_R - oder P_L -Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermo-stabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufwei-
sen. Weiterhin werden neue mutierte P_R - oder P_L -Operatorsequen-
zen sowie deren Verwendung zur temperaturregulierten Expres-
sion von Genen und zur Herstellung verbesserter Impfstoffe
offenbart.

15 Die Initiation der Transkription von der O_R - O_L -Region des Bak-
teriophagen Lambda und anderer lambdoider Phagen wird durch
einen Repressor, das Produkt des cI-Gens, negativ und positiv
reguliert (siehe den Übersichtsartikel Ptashne et al., Cell 19
(1980), 1-11). In der O_R -Region überlappen drei Operatorsequen-
20 zen (O_{R1} , O_{R2} und O_{R3}) die in unterschiedlichen Richtungen
orientierten Promotoren P_R und P_{RM} . P_R steuert die Transkription
von Genen, welche für den lytischen Vermehrungszyklus des
Phagen verantwortlich sind, während P_{RM} der Promotor für das
Lambda cI-Gen ist, welches für das Aufrechterhalten des lyso-
25 genen Zustands verantwortlich ist. Der Lambda-Repressor cI
bindet kooperativ an die Operatorsequenzen O_{R1} und O_{R2} mit dem
Ergebniss, daß P_R reprimiert und P_{RM} aktiviert wird.

Darüberhinaus enthält der Bakteriophage Lambda auch eine wei-
30 tere Operatorregion O_L , die ebenfalls drei Operatorsequenzen
(O_{L1} , O_{L2} und O_{L3}) enthält. Durch Bindung des cI-Repressors an
diese O_L -Operatorregion kann die Expression des Lambda N-Gens
vom P_L -Promotor reprimiert werden.

35 Promotoren des Bakteriophagen Lambda, insbesondere der P_L - und
der P_R -Promotor, werden in der rekombinanten DNA-Technologie
seit langem zur heterologen temperaturregulierten Genexpres-

- 2 -

sion in E.coli verwendet (vgl. Hedgpeth et al., Molec.Gen.Genet. 183 (1978), 197-203 und Bernard et al., Gene 5 (1979), 59-76; Buell et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), 1923 und Shatzman und Rosenberg, Methods Enzymol. 152 (1987), 661). Bei diesen Expressionssystemen wird ein temperatursensitiver Lambda-Repressor cI857 verwendet, welcher die P_L - und P_R -Transkription bei geringen Temperaturen bis 30°C reprimiert, aber bei höheren Temperaturen eine Genexpression ermöglicht.

- 10 Ein Vorteil dieses Lambda-Expressionssystems besteht darin, daß die Induzierung der Genexpression auf einfache Weise durch Temperaturerhöhung bewerkstelligt werden kann und daß hierzu keine Zugabe chemischer Induktoren erforderlich ist. Ein schwerwiegender Nachteil ist jedoch, daß die Repression der 15 Genexpression nur bis zu relativ geringen Temperaturen von maximal 30°C erfolgen, einer Temperatur, bei der ein nur langsames Bakterienwachstum stattfindet. Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein verbessertes System zur Lambda- P_L - oder P_R -Genexpression bereitzustellen, welches eine Repression bei variablen höheren Temperaturen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung mutierter P_R - oder P_L -Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im 25 Vergleich zur Wildtypoperatorsequenz unterschiedliche, insbesondere höhere Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines temperatursensitiven Repressors aufweisen. Die Erkenntnis, daß überhaupt Lambda-Expressionssysteme mit verbesserter Thermostabilität hergestellt werden können, ist höchst überraschend, 30 da außer der temperatursensitiven Lambda cI857-Mutante keine weiteren temperatursensitiven cI-Mutanten bekannt sind, sondern nur solche Mutationen im cI-Repressor, die das Molekül resistenter gegen thermische Inaktivierung machen (Hecht et al., Proteins 1 (1986), 43-46 und Das und Mandal, Mol.Gen.Genet. 204 (1986), 540-542). Noch überraschender war, daß sich 35 Mutationen, welche zu einer verbesserten Thermostabilität führen, in der Operator-DNA-Sequenz und nicht in der für das

Repressormolekül kodierenden DNA-Sequenz befinden. So ist beispielsweise aus der Literatur eine Mutation der Lambda-O_R2-Operatorsequenz bekannt, welche zu einem völligen Verlust der Repressorbindung führt (Hawley et al., J.Biol.Chem. 260 s (1985), 8618-8626).

Zur Identifizierung geeigneter Mutanten wird ein Verfahren bereitgestellt, das die Selektion von mutierten O_R- oder O_L-Operator-DNA-Sequenzen aus lambdoiden Phagen ermöglicht, die 10 eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermo-stabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man (a) eine DNA-Kassette herstellt, die ein Selektionsgen unter operativer Kontrolle einer Expressionskontrollsequenz, umfas- 15 send mindestens eine O_R- oder O_L-Operatorsequenz aus einem lambdoiden Phagen und einen Promotor enthält, (b) die Opera-tor-DNA-Sequenz einer Mutagenese unterzieht und (c) die mu-tierten Operator-DNA-Sequenzen analysiert.

20 Die lambdoiden Phagen werden vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phage Lambda, Phage 21, Phage 22, Phage 82, Phage 424, Phage 434, Phage D326, Phage DLP12, Phage Gamma, Phage HK022, Phage P4, Phage Phi80, Phage Phi81, Coliphage 186 und rekombinanten Variationen davon. Die genannten Phagen 25 sind hinsichtlich des Mechanismus der Repression der Genex-pression über einen cI-Repressor sehr ähnlich (Johnson et al., Nature 294 (1981), 217-223). Rekombinante Variationen der ge-nannten Phagen, z.B. Lambda imm434 können durch Austausch einzelner Genomfragmente innerhalb der genannten Phagen erhal- 30 ten werden (vgl. hierzu Hendricks et al., Lambda 2 (1983), R.W. Hendricks, J.W.Roberts, F.W. Stahl und R.A.Weissberg (HRSG), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Vor-zugsweise wird als lambdoider Phage der Phage Lambda oder eine rekombinante Variation davon, z.B. Lambda imm434 verwendet. 35 Besonders bevorzugt wird zur Mutagenese eine Operator-DNA-Sequenz aus den Operatorregionen O_R (SEQ ID NO. 1) oder/und O_L (SEQ ID NO. 3) des Phagen Lambda und insbesondere eine der

- 4 -

darin enthaltenen Operatorsequenzen O_R1, O_R2 und O_R3 bzw. O_L1, O_L2 und O_L3 verwendet. Am meisten bevorzugt ist die Operatorsequenz O_R2.

s Das Selektionsgen für die DNA-Kassette, welches unter operativer Kontrolle der die mutierte Operatorsequenz enthaltenden Expressionskontrollsequenz, vorzugsweise einer Lambda-Operator/Promotor-Region, gebracht wird, ist vorzugsweise ein Suizidgen, welches bei seiner Expression zum Tod der Bakterienzelle führt und somit als Selektionsmarker zur Identifizierung geeigneter Mutanten dient. Das Suizidgen soll bei einer Temperatur, bei der der Lambda-Repressor an die mutierte Operatorsequenz bindet, so stark reprimiert werden, daß eine die DNA-Kassette enthaltende Bakterienzelle wachsen kann. Bei Überschreiten der maximalen Temperatur, bei der der Repressor noch an den Operator bindet, erfolgt eine Expression des Suizidgens und eine Zerstörung der Bakterienzelle. Auf diese Weise gelingt eine einfache und direkte Selektion von geeigneten mutierten Operatorsequenzen. Ein geeignetes Suizidgen ist das E-
Lysegen aus dem Phagen PhiX174 sowie Homologe und davon abgeleitete Derivate (Hutchison und Sinsheimer, J.Mol.Biol. 18 (1966), 429-447; Witte et al., Multifunctional safety vector systems for DNA cloning, controlled expression of fusion genes, and simplified preparation of vector DNA and recombinant gene products, in BioTech Forum, Advances in Molecular Genetics 3, pp 219-239, Hrsg: Issinger, O.-G., Henke, J., Kämpf, J., Diesel, A.J., Hüthing Verlag 1991, Heidelberg). Weitere Beispiele für geeignete Lysegene sind GEF (Poulsen et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 1627-1637) und Kil (Reisinger et al., Virology 193 (1993), 1033-1036). Andererseits kann das Selektionsgen auch ein Reportergen, wie z.B. das β-Gal-Gen sein.

Die Operator-DNA-Sequenz wird zur Herstellung von Mutanten vorzugsweise einer ortsspezifischen Mutagenese mittels eines oder mehrerer Oligonucleotide beispielsweise nach der Methode von Kunkel (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82 (1985), 488-492) unterzogen oder durch Selektion in einem Mutator-Bakterienstamm,

- 5 -

z.B. einem E.coli mutD oder mutL Mutatorstamm wie etwa E.coli ES1578 (Wu et al., Gene 87 (1990), 1-5) erhalten. Die Selektion der mutierten Operator-DNA-Sequenzen erfolgt vorzugweise durch Bestimmung der Bindefähigkeit mit einem temperatursensitiven cI-Repressor, insbesondere dem temperatursensitiven cI857-Repressor. Hierzu wird die DNA-Kassette, die sich vorzugsweise auf einem Vektor befindet, in eine Bakterienzelle transformiert, die ein für einen temperatursensitiven cI-Repressor kodierendes Gen enthält. Dieses Gen kann ebenfalls auf einem Vektor vorliegen (Remaut et al., Gene 15 (1981), 81-93). Andererseits kann eine Bakterienzelle verwendet werden, die ein solches Repressorgen in seinem Chromosom enthält, z.B. E.coli M5219 (vgl. z.B. Shimatake und Rosenberg, Nature 292 (1981), 128).

15

Durch Kultivierung der mit einer Lysekassette transformierten Bakterienzellen, die mutierte Operator-DNA-Sequenzen enthalten, können auf einfache Weise Mutanten identifiziert werden, die bei unterschiedlich hohen Temperaturen gegenüber einer Lyse resistent sind. Bisher konnten mehrere Mutanten identifiziert werden, die bei Temperaturen bis 33°C, 35°C, 37°C und 39°C gegenüber einer Lyse resistent sind. Diese Bakterien enthalten mutierte Operator-DNA-Sequenzen, die eine Bindung des Repressors bis zu der jeweils angegebenen Temperatur ermöglichen. Ein besonders bevorzugtes Beispiel ist eine Mutante, an die der cI857-Repressor bis zu einer Temperatur von etwa 37°C bindet. Die Mutation gegenüber dem Wildtyp ist ein einziger Basenaustausch im O_R2-Abschnitt der Lambda-O_R-Operatorregion. Die Sequenz dieses mutierten Lambda-O_R-Operators ist in SEQ ID NO. 2 gezeigt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mutierte O_R- oder O_L-Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen, und die durch das oben beschriebene Selektionsverfahren erhältlich sind. Vorzugsweise besitzen die mutierten O_R- oder

- 6 -

O_L-Operatorsequenzen eine erhöhte Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines temperatursensitiven Repressors, insbesondere des temperatursensitiven cI-Repressors. Besonders bevorzugt weisen die mutierten Operatorsequenzen eine um etwa 3 bis 5 10°C, insbesondere eine um etwa 7 bis 9°C erhöhte Thermostabilität gegenüber der Wildtyp-Sequenz auf.

Da das erfindungsgemäße Selektionsverfahren vorzugsweise an O_R- oder O_L-Operatorsequenzen durchgeführt wird, die aus dem Phagen Lambda stammen, betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere mutierte Lambda O_R- oder O_L-Operatorsequenzen, die Varianten der in SEQ ID NO. 1 gezeigten O_R-Operatorsequenzen oder Varianten der in SEQ ID NO. 3 gezeigten O_L-Operatorsequenzen sind. Unter Variante ist in diesem Zusammenhang eine Operatorsequenz zu verstehen, die sich von der Wildtypsequenz in mindestens einer Sequenzposition durch Insertion, Deletion oder Austausch von Basen unterscheidet. Besonders bevorzugt sind die Unterschiede im Bereich der Abschnitte O_R1, O_R2 und O_R3 bzw. O_L1, O_L2 und O_L3. Ein spezifisches Beispiel für eine erfindungsgemäße mutierte Lambda-Operatorsequenz ist die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Lambda-O_R-Operatorsequenz.

Die mutierten Operatorsequenzen erlauben die Herstellung von neuen temperaturregulierten Systemen zur Genexpression, bei denen die Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, im reprimierten Zustand bei variablen Temperaturen, vorzugsweise bei höheren Temperaturen als bisher, insbesondere 33 bis 39°C erfolgen kann. Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung der mutierten O_R- oder O_L-Operatorsequenzen zur temperaturregulierten Expression von Genen in Bakterien, insbesondere in gram-negativen Bakterien wie etwa E.coli. Durch Kombination einer Wildtyp-O_R- oder O_L-Operatorregion und mindestens einer Operatorregion, die eine erfindungsgemäße mutierte Operatorsequenz enthält, oder durch Kombination mehrerer Operatorregionen, die mutierte erfindungsgemäße Operatorsequenzen mit unterschiedlicher Thermo-stabilität enthalten, kann sogar eine temperaturregulierte

sequentielle Expression von Genen erreicht werden.

Vektoren und Bakterienstämme, in denen die erfindungsgemäßen mutierten Operatorsequenzen zur temperaturregulierten Expression von Genen eingesetzt werden können, sind dem Fachmann geläufig. Hier kann auf die aus dem Stand der Technik bekannten Expressionssysteme mit dem Lambda cI857-Repressor in Kombination mit einem geeigneten Promotor, z.B. dem Lambda-P_L oder dem Lambda-P_R-Promotor zurückgegriffen werden (vgl. z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 17.11-17.12).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, umfassend eine bakterielle Expressionskontrollsequenz, d.h. eine Promotor- und Operatorregionen enthaltende Sequenz, die eine erfindungsgemäße mutierte O_R- oder O_L-Operatorsequenz enthält, in operativer Verknüpfung mit einer Protein-kodierenden Sequenz. Die Protein-kodierende Sequenz kann beispielsweise eine für ein eukaryontisches Protein oder Polypeptid kodierende Sequenz oder aber auch ein bakterielles Gen, z.B. das E-Lysegen sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie der bakteriellen Expressionskontrollsequenz in operativer Verknüpfung mit der Protein-kodierenden Sequenz enthält. Dieser Vektor kann ein beliebiger prokaryontischer Vektor sein, z.B. ein chromosomaler Vektor wie etwa ein Bakteriophage oder ein extrachromosomaler Vektor wie etwa ein Plasmid. Geeignete prokaryontische Vektoren sind z.B. bei Sambrook et al., Supra, Kapitel 1-4, beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Bakterienzelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle eine gram-

negative prokaryontische Zelle, besonders bevorzugt eine E.coli-Zelle. Vorzugsweise enthält die Zelle die Nucleinsäure oder den Vektor in ihrem Chromosom integriert und enthält weiterhin ein Gen für einen cI-Repressor aus einem lambdoiden Phagen, insbesondere das Gen für den Lambda-cI857-Repressor.

Eine besonders bevorzugte Anwendung der erfindungsgemäßen mutierten Operatoren liegt auf dem Gebiet der Impfstoffherstellung. Aus dem Stand der Technik sind sogenannte "Bakterienghosts" als Impfstoffe bekannt, d.h. Bakterienhüllen, die mittels Protein-E-induzierter Lyse aus gram-negativen Bakterien, z.B. E.coli Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae etc. hergestellt werden konnten. Diese Ghosts, die in der Beschaffenheit ihrer Zelloberfläche sowie den vom Immunsystem erkennbaren Repertoire an Oberflächenantigenen dem aktiven Pathogen weitgehend gleichen, rufen in verschiedenen Tiermodellen eine protektive zelluläre oder/und humorale Immunantwort hervor.

Die Herstellungsweise der Ghosts beruht auf der stringent kontrollierten Expression des E-Lysegens aus PhiX174, dessen Expressionsprodukt einen Tunnel durch die bakterielle Zellwandhülle ausbildet und so zum Ausströmen des Zellinhalts der Wirtszelle führt. Die Regulation dieses für die Zelle letalen Gens kann über einen Lambda-Repressor ausgeübt werden, z.B. den temperatursensitiven Lambda-Repressor cI857, der wie zuvor ausgeführt bei Temperaturen über 30°C seine Funktion verliert. Dies bedingte, daß die bisher zur Produktion von Bakterienghosts verwendeten Bakterienkulturen bei niedrigen Temperaturen, bevorzugt bei 28°C, angezogen werden mußten.

Gleichwohl es mit dieser Methodik zu befriedigenden Resultaten bezüglich der Immunogenität der hergestellten Ghosts gekommen ist, ist eine Verbesserung der Bakterienkultivierung dringend erstrebenswert, da das Repertoire der antigenen Determinanten auf der bakteriellen Oberfläche sich in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen ändern kann. Da pathogene Bakterien, die

- 9 -

Mensch oder Tier befallen, meist in einer Umgebungstemperatur von 37 bis 39°C siedeln, sollte diese "natürliche" Umgebungstemperatur auch während des Herstellungsverfahrens von Ghosts eingehalten werden können.

5

Ein Verfahren zur Herstellung von Bakterienghosts, welches diese Aufgabe löst, wird durch Verwendung der erfindungsgemäßen mutierten Operatorsequenzen bereitgestellt. Diese Operatorsequenzen erlauben bis zu einem Temperaturbereich von vorzugsweise 35 bis 39°C das Wachstum der Bakterien und erlauben bei einer Temperaturerhöhung von 37 bis 42°C die Lyse. Dieses veränderte Lyseverhalten ermöglicht die Anzucht der Krankheitserreger nahe der Körpertemperatur des Impfkandidaten, was für die Zusammensetzung der äußeren Membran äußerst wichtig ist. Darüberhinaus kann die neue Lysekassette auch als Sicherheitskassette bei Lebendvakzinen eingesetzt werden, da z.B. im Menschen bei Induktion von Fieber (39°C) die Abtötung der Impfbakterien erfolgt.

20 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Impfstoffzusammensetzung, die eine lebende erfindungsgemäße Bakterienzelle als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen enthält. Die lebende Bakterienzelle enthält eine Nucleinsäure, umfassend 25 eine bakterielle Expressionskontrollsequenz mit einer mutierten Operatorsequenz in operativer Verknüpfung vorzugsweise mit einem Lysegen. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Impfstoffzusammensetzung, die einen Bakterienghost als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen enthält, wobei der Bakterienghost durch Kultivierung einer erfindungsgemäßen Bakterienzelle bei Temperaturen von 35 - 39°C und anschließende Lyse der Bakterienzelle durch Temperaturerhöhung erhältlich ist. Als Impfstoffe geeignete Bakterienzellen sind insbesondere gram-negative Bakterien wie etwa E.coli, beispielsweise die Stämme STEC, EHEC, O78:K80, Salmonellen wie etwa S.choleraesuis, S.enteritidis und S.typhimurium, Pasteurella

- 10 -

multocida, Pasteurella haemolytica, Bordetella bronchiseptica, Klebsiella pneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus influenzae, Vibrio cholerae, Helicobacter pylori, Alcaligenes eutrophus, Campylobacter jejuni und Pseudomonas aeruginosa.

Die erfindungsgemäßen modifizierten Impfstoffzusammensetzungen können oral, aerogen oder parenteral auf die Impfkandidaten übertragen werden. Dabei wird bei der Impfstoffapplikation vorzugsweise der natürliche Weg gewählt, den entsprechenden Mikroorganismen für die Infektion und die Anfangsstadien der Etablierung einer Infektionskrankheit wählen. Da bei den erfindungsgemäßen Vakzinen alle Oberflächeneigenschaften erhalten bleiben, kann durch diese Applikation eine lokale Induktion der Immunantwort erfolgen, wie sie auch beim natürlichen Infektionsprozess auftritt.

Wie oben ausgeführt, können durch Anwendung erfindungsgemäßer mutierter Operatorsequenzen Vakzine entwickelt werden, die bei Überschreiten einer Sollwert-Temperatur kontrolliert lysiert werden. Weiterhin kann jedoch auch eine kältesensitive Suizidkassette bereitgestellt werden, die gram-negative Bakterien, die als Lebendvakzine eingesetzt werden, bei Freisetzung in die Umwelt abtötet. So kann durch Kombination von zwei genetischen Regulationssystemen ein Absterben der Bakterien bei Unterschreiten eines Sollwerts der Umgebungstemperatur durch Expression des Suizidgens erfolgen. Diese Sicherheitskassette gewährleistet die Abtötung von Lebendvakzinen auch bei einer Ausscheidung aus dem Organismus.

30

Die Erfindung betrifft somit eine Nucleinsäure, umfassend (a) eine erste bakterielle Expressionskontrollsequenz, die eine O_R - oder O_L -Operatorsequenz aus einem lambdoiden Phagen enthält und an die ein erster temperatursensitiver cI Repressor aus lambdoiden Phagen binden kann, in operativer Verknüpfung mit einer für einen zweiten Repressor kodierenden Sequenz, wobei der zweite Repressor nicht an die erste bakterielle Express-

- 11 -

sionssequenz binden kann, und (b) eine zweite bakterielle Expressionskontrollsequenz, an die der zweite Repressor binden kann, in operativer Verknüpfung mit einem Suizidgen.

- 5 Die Komponenten (a) und (b) können kovalent miteinander verknüpft, z.B. auf einen einzigen Vektor, vorliegen oder auch voneinander getrennt, z.B. auf unterschiedlichen Vektoren, sein, oder getrennt oder gemeinsam auf dem Chromosom eines Empfängerbakteriums lokalisiert sein.

10

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Bakterienzelle, die mindestens eine Kopie einer wie zuvor definierten Nucleinsäure enthält. Weiterhin enthält die Bakterienzelle zweckmäßigerweise ein Gen für den ersten Repressor.

- 15 Der erste Repressor ist vorzugsweise der temperatursensitive cI857-Repressor.

Die erfindungsgemäße Sicherheitskassette enthält vorzugsweise ein Gen, welches für einen temperatursensitiven cI-Repressor,

- 20 z.B. den Repressor cI857 kodiert, und ein Gen, das für einen zweiten Repressor kodiert, wobei dieses Gen unter Kontrolle einer Lambda-Promotor/Operator-Region steht, an die der temperatursensitive Repressor bindet. Der zweite Repressor steuert wiederum die Expression eines anderen Gens, z.B. eines Suizidgens, wie das E-Lysegen. Bei 37°C ist der temperatursensitive Lambda-Repressor inaktiv, so daß der zweite Repressor exprimiert wird, wodurch wiederum die Expression des Suizidgens reprimiert wird.

- 30 Bei Verringerung der Temperatur bindet der temperatursensitive Lambda-Repressor an den Operator, so daß die Expression des zweiten Repressors blockiert wird, was zu einer Expression des Suizidgens führt. Bevorzugt ist für diese Sicherheitskassette eine erste Expressionskontrollsequenz, die den mutierten 35 Lambda-Operator enthält, da hierbei eine bessere und schnellere Aktivierung des Suizidgens erhalten wird.

- 12 -

Der zweite Repressor kann ein beliebiger Repressor sein, ein lac-Repressor. Bevorzugt ist jedoch die Verwendung eines weiteren Repressors aus lambdoiden Phagen, z.B. cI aus dem Phagen 434, der nicht temperatursensitiv ist und an eine eigene Operatorsequenz, aber nicht an die vom Lambda-Repressor cI857 erkannte Sequenz bindet.

Besonders bevorzugt ist es, für die Entwicklung von Lebendimpfstoffen sowohl eine Hitze- als auch ein Kältereulations-
10 element einzubauen. Dieses Einbauen erfolgt vorzugsweise durch homologe Rekombination in das Chromosom des Impfbakteriums.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Bakterienzelle, die neben den beiden Komponenten (a) und (b) als Komponente (c) eine dritte bakterielle Expressionskontrollsequenz, die eine erfindungsgemäße mutierte Operatorsequenz enthält, in operativer Verknüpfung mit einem Suizidgen umfaßt.

Auch diese Bakterienzellen können in Impfstoffzusammensetzungen insbesondere für Lebendvakzine eingesetzt werden. Auf diese Weise können wärme- oder/und kälteempfindliche Sicherheitslebendvakzine bereitgestellt werden, die bei einer Erhöhung der Körpertemperatur des Impfkandidaten, z.B. durch Fieber, oder/und bei Ausscheidung in die Umgebung zu einem Absterben der Impfbakterien führen.
25

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren, Sequenzprotokolle und Beispiele erläutert werden.

30 Es zeigen:

Fig. 1a die schematische Darstellung einer Lysekassette des Standes der Technik, umfassend eine Lambda- λ_R -Wildtyp-Region, das Lambda-cI857-Gen unter Kontrolle des Promotors P_{RM} und das E-Lysegen unter Kontrolle des Promotors P_R ;
35

- Fig. 1b die schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Lysekassette, die eine mutierte Lambda- O_R -Sequenz enthält;
- 5 Fig. 2a die schematische Darstellung einer kälteempfindlichen Sicherheitskassette, umfassend eine Wildtyp (pCS1) bzw. mutierte (pCSJ1) O_R -Operatorsequenz, das Lambda-cI857-Gen unter Kontrolle des Promotors P_{RM} , das Gen des lacI-Repressors unter Kontrolle von P_R und das E-Lysegen unter Kontrolle des lac-Promotor-/Operatorsystems, bei einer Temperatur, bei der der temperatursensitive Lambda-Repressor cI857 nicht an die Lambda O_R -Sequenz bindet;
- 10 Fig. 2b die schematische Darstellung der Sicherheitskassette gemäß Fig. 2a bei einer Temperatur, bei der der Lambda-Repressor cI857 an den Lambda O_R -Operator bindet;
- 15 Fig. 3 die Lysekurve von Bakterienzellen (optische Dichte gegen Zeit), die ein Plasmid mit der in Fig. 1b gezeigten Lysekassette enthalten;
- 20 Fig. 4 die Lysekurve einer Bakterienzelle, die eine kältesensitive Sicherheitskassette mit dem Wildtyp O_R -Operator enthält und
- 25 Fig. 5 ein Vergleich der Lysekurven von Bakterienzellen, die eine kältesensitive Sicherheitslysekassette mit dem Wildtyp O_R -Operator (pCS1) bzw. dem mutierten Operator (pCSJ1) enthalten,
- 30 Fig. 6a die schematische Darstellung einer kältesensitiven Sicherheitskassette, umfassend eine Wildtyp (pCS2) bzw. mutierte (pCSJ2) O_R -Operatorsequenz, das Lambda-cI857-Gen unter Kontrolle des Promotors P_{RM} , das Gen des Phage 434 cI-Repressors unter Kontrolle von Lambda P_R und das E-Lysegen unter Kontrolle des 434 O_R ($P_{RM}-P_R$) Promotor/Operator-Systems, bei einer Temperatur, bei der der temperatursensitive Lambda-Repressor cI857 nicht an die Lambda- O_R -Sequenz bindet,
- 35 Fig. 6b die schematische Darstellung der Sicherheitskassette gemäß Fig. 6a bei einer Temperatur, bei der der

- 14 -

Lambda-Repressor cI857 an den Lambda O_R-Operator bindet;

- SEQ ID NO. 1 die Nucleotidsequenz des Lambda-O_R-Operators;
5 die Operatorsequenz O_R3 reicht von Position 11 - 27; die Operatorsequenz O_R2 reicht von Position 34 - 41; die Operatorsequenz O_R1 reicht von Position 58 - 74;
- SEQ ID NO. 2 die Nucleotidsequenz eines mutierten Lambda-O_R-
10 Operators, die gegenüber der Wildtypsequenz einen Austausch von T → C an Position 42 aufweist;
- SEQ ID NO. 3 die Nucleotidsequenz des Lambda-O_L-Operators;
15 die Operatorsequenz O_L3 reicht von Position 11 - 27; die Operatorsequenz O_L2 reicht von Position 31 - 47; die Operatorsequenz O_L1 reicht von Position 55 - 70;
- SEQ ID NO. 4 bis 6
20 ein 1601 bp langes DNA-Fragment des Plasmids pAW12; bp 1 - 983 stammen aus dem Bakteriophagen Lambda (Position 37125 - 38107; vgl. Sanger et al., J.Mol.Biol. 162 (1982), 729-773) und enthalten das Lambda-cI857-Gen (Position 816-106; SEQ ID NO. 5) sowie die mutierte O_R-Operatorregion (Mutation an Position 858 T → C); bp
25 1023 - 1601 stammen aus dem Phagen PhiX174 (Position 447 - 1026; vgl. Sanger et al., J.Mol.Biol. 125 (1978), 225-246) und enthalten das E-Lysegen (Position 1144-1416; SEQ ID NO. 6);
- 30 SEQ ID NO. 7 bis 10
35 ein 2834 bp langes DNA-Fragment des Plasmids pCSJ; bp 1 - 983 stammen aus dem Bakteriophagen Lambda (Position 37125 - 38107) und enthalten das cI857-Gen (Postion 816-106; SEQ ID NO. 5) sowie die mutierte Lambda-O_R-Region (Mutation an Position 858 T → C); bp 990 - 2230 stammen

- 15 -

aus dem E.coli lac-Operon subkloniert auf dem Plasmid pMC7 (Calos, Nature 274 (1978), 762-765) und enthalten das lacI-Repressorgen (bp 1025-2104; SEQ ID NO. 9) und den lac-Promotor/-Operator; bp 2256-2834 stammen aus dem Bakteriophagen PhiX174 (Position 447 - 1026) und enthalten das E-Lysegen (bp 2377-2649; SEQ ID NO. 10).

10 **BEISPIELE**

Beispiel 1:

1.1. Random-Mutagenese der Lambda- P_R -Operatorregion

15

Als Ausgangsmaterial wurde das Plasmid pAW12 (Witte und Lubitz, Eur.J.Biochem. 180 (1989), 393-398) gewählt, welches das Lysegen E aus dem Bakteriophagen PhiX174 unter Kontrolle des Lambda- P_R -Promotors sowie das zugehörige Repressoren cI857 enthält. Ziel dieses Versuchs war eine Veränderung der Lysekassette, so daß das Lysegen E nicht bereits bei 30°C, sondern bei höheren Temperaturen aktiviert wird. Hierzu wurde der E.coli Mutatorstamm ES1578 (Wu et al., (1990), supra) mit dem Lyseplasmid transformiert und eine Selektion auf Klone mit einem veränderten Temperaturprofil der Zellyse durchgeführt.

Dabei wurden die aus der Transformation hervorgegangenen mutierten Klone nach Überstempeln auf Testplatten mit Lyseselektivmedium (LB mit 1% SDS) und Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (z.B. 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C) erkannt. Durch Plasmidextraktion und anschließende Transformation in einen Nicht-Mutatorteststamm wurde das veränderte Lyseprofil der Lysekassette in Flüssigkultur genau bestimmt.

35

Die Art der Mutation wurde durch Subklonierung der mutagenisierten Lysekassetten in ein Sequenzierplasmid bestimmt. Zu-

- 16 -

sätzlich wurde zur funktionellen Prüfung das Lysegen E gegen das β -Galactosidasegen ausgetauscht. Anhand eines einfachen β -Gal-Tests konnte dann quantitativ der reprimierte oder aktive Zustand der Genkassette gemessen werden.

5

Auf diese Weise konnten mehrere Klone mit einem unterschiedlichen Temperaturlyseprofil erhalten werden. Diese Klone erlaubten in einem Temperaturbereich von 33-39°C das Wachstum der Bakterien und führten erst bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf 37-42°C zur Lyse der Bakterien.

Durch Sequenzierung eines mutierten Klons, der eine Temperaturbeständigkeit bis 37°C aufweist, wurde eine Mutation der O_R -Operatorregion (SEQ ID NO. 2) identifiziert.

15

1.2. Verifizierung der Mutation

Zur Verifizierung der in Beispiel 1.1. erhaltenen Mutation wurde eine ortsspezifische Mutagenese der Lambda O_R -Wildtypsequenz unter Verwendung eines Oligonucleotids durchgeführt.

Die Mutagenese wurde ausgeführt nach dem Protokoll von Kunkel (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82 (1985), 488-492).

25 4 ml Übernachtkultur des E.coli-Stammes CJ236 (dut⁻, ung⁻) wurden in 50 ml LB-Medium (+ 10 μ g/ml Chloramphenicol und 0,25 μ g/ml Uridin) gegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 100 μ l M13-Phagen zugesetzt und 6 h bei 37°C inkubiert.

30 Die Kultur wurde in 2 SS34-Zentrifugenröhrenchen 10 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in neue Röhrchen dekantiert und zur weiteren Reingigung nochmals zentrifugiert.

35 Durch Zugabe von 5 ml 5x Polyethylenglycol/NaCl wurden die Phagen 1 h bei 4°C gefällt. Dann wurde 10 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

- 17 -

Das Pellet wurde getrocknet, in 0,8 ml TES-Puffer (0,1 M Tris HCl, pH 8; 0,3 M NaCl; 1mM EDTA) suspendiert und 1 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf 2 Eppendorfgefäße aufgeteilt und 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die aufgebrochenen Phagen befanden, wurde abgenommen und einer Phenol/Chloroform-Extraktion zur Gewinnung der DNA unterzogen. Die resultierende DNA wurde mit dem 2,5-fachen Volumen 96% Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 60 µl H₂O aufgenommen.

10

Ein Oligonucleotid mit der Sequenz 5'-GTA AAA TAG TCA ACA CGC GCG GTG TTA GAT ATT TAT C-3' wurde phosphoryliert. Hierzu wurden 20 µl H₂O, 20 µl Oligonucleotid (20 ng), 4,5 µl Kinase-Puffer (Stratagene) und 0,5 µl Polynucleotidkinase (5 U, Stratagene) 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 7 µl 0,1 M EDTA zugegeben und 10 min auf 65°C erhitzt.

Zum Annealing wurden 20 µl phosphoryliertes Oligonucleotid, 3,5 µl einzelsträngige DNA-Matrize (1 µg ssDNA wie zuvor beschrieben hergestellt) und 1,4 µl 20 x SSC-Puffer 5 min auf 70°C erhitzt, langsam bis 25°C abgekühlt und dann auf Eis gestellt.

Zur Extension wurden 10 µl des Reaktionsgemisches aus dem Annealingansatz, 37,5 µl XL-Puffer (27 mM Hepes pH 7,8, jeweils 5 mM dNTP, 13 mM MgCl₂, 2,7 mM Dithiothreitol, 1,3 mM ATP, 1 µl Ligase (1 U, Boehringer Mannheim), 1,5 µl T4-Polymerase (1,5 U, Boehringer Mannheim), 1,5 µl T4-Gen32-Protein (8 µg, Boehringer Mannheim) 10 min auf Eis, 10 min bei Raumtemperatur und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach 1 h erfolgte die Zugabe von 1 µl Ligase und 1 µl T4-DNA-Polymerase. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl 0,25 M EDTA gestoppt.

35 Zur Transformation wurden 100 µl kompetente E.coli Zellen JM103 (Messing et al., Nucleic Acids.Res. 9 (1981), 309-321) mit 10 µl DNA aus dem Extensionsansatz versetzt und 1 h oder

mehr auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2,5 min bei 42°C wurden 0,2 ml frische JM103-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zugesetzt. Die Zellen wurden mit 3 ml Soft Agar vermischt und auf eine LB-Agarplatte ausgeimpft. Anschließend erfolgte Inkubation über Nacht bei 37°C.

Zur Identifizierung der Mutanten wurden mit einer Pasteurpipette Plaques ausgestochen und in 5 ml LB-Medium, dem 400 µl einer Übernachtkultur von E.coli JM103 zugesetzt wurden, angeimpft. Nach 3 h Wachstum bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert. Aus dem Zellpellet wurden mittels Plasmidpräparation doppelsträngige M13-Plasmide gewonnen. Aus dem Überstand können einzelsträngige M13-Phagen isoliert werden.

15 Beispiel 2:

Analyse der mutagenisierten Lysekassetten

Die Figuren 1 und 2 zeigen unterschiedliche E-spezifische Lysekassetten mit verschiedenen Temperaturinduktionen der Lysefunktion.

In Fig. 1a, welches die Wildtyp-Lambda-O_R-Operatorsequenz enthält, erfolgt bis 30°C eine Repression der Funktion des E-Lysegens durch das cI857-kodierte Repressorprotein am vorgeschalteten Lambda-P_R-Promotor/Operatorbereich. Bei Temperaturen über 30°C werden cI857-spezifische Repressormoleküle thermisch inaktiviert und die Expression des E-Gens induziert. Fig. 1b zeigt das Plasmid pAWJ12, welches eine mutierte Operatorsequenz (SEQ ID NO. 2) enthält, so daß die Repression der Lysefunktion des Gens E mit Hilfe von cI857 bis 37°C erfolgt und eine Induktion der Lysefunktion erst bei 39°C oder höher erfolgt.

In Fig. 2 ist die Funktion einer kältesensitiven Sicherheitskassette erläutert. Fig. 2a zeigt, daß in den Plasmiden pCS1 (Wildtypoperator) und pCSJ1 (mutierter Operator) bei einer

- 19 -

Temperatur von $\geq 32^{\circ}\text{C}$ (pCS1) bzw. $\geq 39^{\circ}\text{C}$ (pCSJ1) die Bildung von lacI-spezifischen Repressormolekülen induziert wird, die wiederum die Expression des E-Gens reprimieren. Bei einer Temperatur unterhalb von 30°C (pCS1) bzw. 37°C (pCSJ1) kommt es zur Ausbildung von funktionsfähiger cI857-Repressormoleküle, die die Bildung von lacI-spezifischen Repressormolekülen unterbinden und so die Expression des E-Gens freigeben (Fig. 2b). Im Plasmid pCSJ1 erfolgt die einhergehende Zellyse schneller als in pCS1.

10

Fig. 3 zeigt die Lysekurve einer das Plasmid pAWJ12 (mutierter Operator) enthaltenden Bakterienzelle. 3 Stunden nach Beginn der Kultivierung wurde die Temperatur von 37°C in einem Aliquot der Bakterienzellen beibehalten, und in zwei anderen 15 Aliquots auf 38 bzw. 42°C erhöht. Bei 37°C findet man ein weiteres Wachstum der Bakterien, während bei 38°C bereits eine Lyse stattfindet. Bei 42°C ist die Lyse deutlich verstärkt.

Die Figuren 4 und 5 zeigen die Funktion einer kältesensitiven 20 Sicherheitskassette. In Fig. 4 wurden Bakterienzellen, die das Plasmid pCS1 (Wildtypoperator) enthielten, einer Temperaturänderung von 37 auf 28°C ausgesetzt. Diese Temperaturverringering führte zu einem Anschalten des E-Lysegens und zu einem Absterben der Zellen (Abnahme der optischen Dichte).

25

Fig. 5 zeigt einen Vergleich der Lysegeschwindigkeit von Bakterien, die das Plasmid pCS1 (Wildtypoperator) und das Plasmid pCSJ1 (mutierter Operator) enthalten. Es ist zu erkennen, daß die Lyse bei den Bakterien, welche den mutierten Operator 30 enthalten, wesentlich schneller stattfindet.

Fig. 6 zeigt eine weitere kältesensitive Sicherheitskassette. Die Plasmide pCS2 (Wildtyp-Operator) und pCSJ2 (mutierter Operator) zeigen bei Temperaturen, bei denen der Lambda cI857-35 Repressor nicht an den Operator bindet, die Bildung von cI-434 Repressormolekülen, die die Expression des E-Gens reprimieren (Fig. 6a). Bei einer Temperatur, bei der der cI857-Repressor

- 20 -

an den Lambda-Operator bindet, wird die Bildung von cI-434-spezifischen Repressormolekülen unterbunden und so die Expression des E-Gens freigegeben (Fig. 6b).

5 Beispiel 3:

In vivo Analyse von kältesensitiven Lysekassetten

Es wurde die Abtötung von Bakterien durch Temperaturerniedrigung nach Passage durch einen Mäusedarm und Freisetzung durch Kot bestimmt.

Hierzu wurden jeweils einmal 10^{10} E.coli Bakterien Balb/c-Mäusen verabreicht und die im Kot freigesetzte Anzahl von Bakterien bestimmt. Die Auswertung erfolgte auf E.coli-spezifischen Endoplatten (Endo, Zentralbl. Bakt. I Orig. 35 (1904) 109-110) mit Tetrazyklin als Marker für die eingesetzten Plasmide. Die Inkubation erfolgte bei 28°C.

20 Ergebnis:

Gegenüber einer Kontrolle aus E.coli NM522 (pAWJ-lac) kommt es bei den Versuchsgruppen E.coli NM522 (pCS2), E.coli MC4100 (pCS1) und E.coli MC4100 (pCSJ1) zu einer Keimzahlreduktion von mindestens 99,9 %, 98% und 80% gemessen 10 h und 20 h nach Verabreichung der E.coli Bakterien.

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- 10 (A) NAME: Prof. Dr. Werner Lubitz
(B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7
(C) ORT: Wien
(E) LAND: Oesterreich
(F) POSTLEITZAHL: 1080

15 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Systeme zur Regulation der Genexpression

20 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

25 (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
25 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPA)

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 35 (A) LÄNGE: 82 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

40 (vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Lambda-OR-Operator (Wildtyp)

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ACGTTAAATC TATCACCGCA AGGGATAAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTG ACTATTTAC

60

CTCTGGCGGT GATAATGGTT GC

82

50

55

- 22 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 5 (A) LÄNGE: 82 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

10

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Lambda-OR-Operator (Mutante)

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ACGTTAAATC TATCACCGCA AGGGATAAAAT ATCTAACACC GCGCGTGTG ACTATTTAC
 20 CTCTGGCGGT GATAATGGTT GC

60

82

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 30 (A) LÄNGE: 85 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

35 (A) ORGANISMUS: Lambda-OL-Operator (Wildtyp)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

40 ACATACAGAT AACCATCTGC GGTGATAAAAT TATCTCTGGC GGTGTTGACA TAAATACCAC
 TGGCGGTGAT ACTGAGGCACA TCAGC

60

85

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 50 (A) LÄNGE: 1601 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: beides

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

55 (A) ORGANISMUS: pAW12 Fragment

- 23 -

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:complement (106..816)

5

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:1144..1416

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

15	ATTTACTATG TTATGTTCTG AGGGGAGTGA AAATTCCCCT AATTGATGA AGATTCTTGC	60
	TCAATTGTTA TCAGCTATGC GCCGACCAGA ACACCTTGCC GATCAGCCAA ACGTCTCTTC	120
	AGGCCACTGA CTAGCGATAA CTTTCCCCAC AACGGAACAA CTCTCATGTC ATGGGATCAT	180
20	TGGGTACTGT GGGTTTAGTG GTTGTAAAAA CACCTGACCG CTATCCCTGA TCAGTTTCTT	240
	GAAGGTAAAC TCATCACCCC CAAGTCTGGC TATGCAGAAA TCACCTGGCT CAACAGCCTG	300
	CTCAGGGTCA ACGAGAATTAA ACATTCCGTC AGGAAAGCTT GGCTTGGAGC CTGTTGGTGC	360
25	GGTCATGGAA TTACCTTCAA CCTCAAGCCA GAATGCAGAA TCACTGGCTT TTTTGGTTGT	420
	GCTTACCCAT CTCTCCGCAT CACCTTTGGT AAAGGTTCTA AGCTTAGGTG AGAACATCCC	480
30	TGCCTGAACA TGAGAAAAAA CAGGGTACTC ATACTCACTT CTAAGTGACG GCTGCATACT	540
	AACCGCTTCA TACATCTCGT AGATTTCTCT GGCGATTGAA GGGCTAAATT CTTCAACGCT	600
	AACTTGAGA ATTTTGAA GCAATGCGGC GTTATAAGCA TTTAATGCAT TGATGCCATT	660
35	AAATAAAGCA CCAACGCCTG ACTGCCCAT CCCCATCTTG TCTGCGACAG ATTCTGGGA	720
	TAAGCCAAGT TCATTTTCTT TTTTTTCATA AATTGCTTTA AGGCGACGTG CGTCCTCAAG	780
40	CTGCTCTTGT GTTAATGGTT TCTTTTTGT GCTCATACGT TAAATCTATC ACCGCAAGGG	840
	ATAAATATCT AACACCGCGC GTGTTGACTA TTTTACCTCT GGCGGTGATA ATGGTTGCAT	900
	GTACTAAGTA GGTTGTATGG ACAACGCAT AACCTGAAA GATTATGCAA TCGCCTTGG	960
45	GCAAACCAAG ACAGCTAAAG ATCCTCTAGA GTCGACCTGC AGGCATGCAA GCTTATCGAA	1020
	TTCTCATTCA GGCTTCTGCC GTTTGGATT TAACCGAAGA TGATTCGAT TTTCTGACGA	1080
50	GTAACAAAGT TTGGATTGCT ACTGACCGCT CTCGTGCTCG TCGCTGCGTT GAGGCTTGCG	1140
	TTT ATG GTA CGC TGG ACT TTG TGG GAT ACC CTC GCT TTC CTG CTC CTG	1188
	Met Val Arg Trp Thr Leu Trp Asp Thr Leu Ala Phe Leu Leu Leu	
	1 5 10 15	
55	TTG AGT TTA TTG CTG CCG TCA TTG CTT ATT ATG TTC ATC CCG TCA ACA	1236
	Leu Ser Leu Leu Pro Ser Leu Leu Ile Met Phe Ile Pro Ser Thr	
	20 25 30	
60	TTC AAA CGG CCT GTC TCA TCA TGG AAG GCG CTG AAT TTA CGG AAA ACA	1284
	Phe Lys Arg Pro Val Ser Ser Trp Lys Ala Leu Asn Leu Arg Lys Thr	
	35 40 45	

- 24 -

TTA TTA ATG GCG TCG AGC GTC CGG TTA AAG CCG CTG AAT TGT TCG CGT Leu Leu Met Ala Ser Ser Val Arg Leu Lys Pro Leu Asn Cys Ser Arg 50 55 60	1332
5 TTA CCT TGC GTG TAC GCG CAG GAA ACA CTG ACG TTC TTA CTG ACG CAG Leu Pro Cys Val Tyr Ala Gln Glu Thr Leu Thr Phe Leu Leu Thr Gln 65 70 75	1380
10 AAG AAA ACG TGC GTC AAA AAT TAC GTG CAG AAG GAG TGATGTAATG Lys Lys Thr Cys Val Lys Asn Tyr Val Gln Lys Glu 80 85 90	1426
15 TCTAAAGGTA AAAAACGTTG TGGCGCTCGC CCTGGTCGTC CGCAGCCGTT GCGAGGTACT	1486
15 AAAGGCAAGC GTAAAGGCGC TCGTCTTG TATGTAGGTG GTCAACAATT TTAATTGCAG GGGCTTCGGC CCTTACTTGA GGATAAAATTA TGTCTAATAT TCAAACGGC GCCGA	1546
	1601

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 25 (A) LÄNGE: 237 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

35 Met Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala 1 5 10 15	80
Arg Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu 20 25 30	85
40 Ser Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val 35 40 45	90
45 Gly Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala 50 55 60	95
Leu Leu Thr Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser 65 70 75 80	100
50 Ile Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Tyr Glu Ala Val Ser Met Gln Pro 85 90 95	105
55 Ser Leu Arg Ser Glu Tyr Glu Tyr Pro Val Phe Ser His Val Gln Ala 100 105 110	115
Gly Met Phe Ser Pro Lys Leu Arg Thr Phe Thr Lys Gly Asp Ala Glu 115 120 125	120
60 Arg Trp Val Ser Thr Thr Lys Lys Ala Ser Asp Ser Ala Phe Trp Leu 130 135 140	145
Glu Val Glu Gly Asn Ser Met Thr Ala Pro Thr Gly Ser Lys Pro Ser 150 155 160	150

- 25 -

Phe	Pro	Asp	Gly	Met	Leu	Ile	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Gln	Ala	Val	Glu	
				165				170					175			
5	Pro	Gly	Asp	Phe	Cys	Ile	Ala	Arg	Leu	Gly	Gly	Asp	Glu	Phe	Thr	Phe
				180				185					190			
10	Lys	Lys	Leu	Ile	Arg	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Leu	Gln	Pro	Leu	Asn
				195				200					205			
15	Pro	Gln	Tyr	Pro	Met	Ile	Pro	Cys	Asn	Glu	Ser	Cys	Ser	Val	Val	Gly
				210			215					220				
20	Lys	Val	Ile	Ala	Ser	Gln	Trp	Pro	Glu	Glu	Thr	Phe	Gly			
				225			230				235					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- 20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 91 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

- 25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met	Val	Arg	Trp	Thr	Leu	Trp	Asp	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	
1				5				10					15			
35	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Met	Phe	Ile	Pro	Ser	Thr	Phe
				20				25				30				
40	Lys	Arg	Pro	Val	Ser	Ser	Trp	Lys	Ala	Leu	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Leu
				35				40				45				
45	Leu	Met	Ala	Ser	Ser	Val	Arg	Leu	Lys	Pro	Leu	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu
				50			55				60					
50	Pro	Cys	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Thr	Leu	Thr	Phe	Leu	Leu	Thr	Gln	Lys
				65			70			75			80			
	Lys	Thr	Cys	Val	Lys	Asn	Tyr	Val	Gln	Lys	Glu					
					85				90							

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- 55 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 2834 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: beides

- 26 -

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: pCSJ Fragment

5 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:complement (106..816)

10 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:1025..2104

15 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:2377..2649

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ATTTACTATG TTATGTTCTG AGGGGAGTGA AAATTCCCCT AATTCGATGA AGATTCTTGC	60	
25 TCAATTGTTA TCAGCTATGC GCCGACCAGA ACACCTTGCC GATCAGCCAA ACGTCTCTTC	120	
AGGCCACTGA CTAGCGATAA CTTTCCCCAC AACGGAACAA CTCTCATTGC ATGGGATCAT	180	
TGGGTACTGT GGGTTTAGTG GTTGTAAAAA CACCTGACCG CTATCCCTGA TCAGTTCTT	240	
30 GAAGGTAAAC TCATCACCCC CAAGTCTGGC TATGCAGAAA TCACCTGGCT CAACAGCCTG	300	
CTCAGGGTCA ACGAGAATTAA ACATTCCGTC AGGAAAGCTT GGCTTGGAGC CTGTTGGTGC	360	
35 GGTCACTGGAA TTACCTCAA CCTCAAGCCA GAATGCAGAA TCACTGGCTT TTTTGGTTGT	420	
GCTTACCCAT CTCTCCGCAT CACCTTTGGT AAAGGTTCTA AGCTTAGGTG AGAACATCCC	480	
TGCCTGAACA TGAGAAAAAA CAGGGTACTC ATACTCACTT CTAAGTGACG GCTGCATACT	540	
40 AACCGCTTCA TACATCTCGT AGATTTCTCT GGCGATTGAA GGGCTAAATT CTTCAACGCT	600	
AACTTTGAGA ATTTTGTA GCAATGCGGC GTTATAAGCA TTTAATGCAT TGATGCCATT	660	
45 AAATAAAAGCA CCAACGCCCTG ACTGCCCAT CCCCATCTTG TCTGCGACAG ATTCTGGGA	720	
TAAGCCAAGT TCATTTTCT TTTTTCTATA AATTGCTTTA AGGCGACGTG CGTCCTCAAG	780	
CTGCTCTTGT GTTAATGGTT TCTTTTTGT GCTCATACGT TAAATCTATC ACCGCAAGGG	840	
50 ATAAATATCT AACACCGCGC GTGTTGACTA TTTTACCTCT GGCGGTGATA ATGGTTGCAT	900	
GTACTAAGTA GGTTGTATGG AACAAACGCAT AACCTGAAA GATTATGCAA TGCGCTTG	960	
55 GCAAACCAAG ACAGCTAAAG ATCCTCTAGA GCGCCCGGAA GAGAGTCAT TCAGGGTGGT	1020	
GAAT GTG AAA CCA GTA ACG TTA TAC GAT GTC GCA GAG TAT GCC GGT GTC	1069	
Val Lys Pro Val Thr Leu Tyr Asp Val Ala Glu Tyr Ala Gly Val		
95	100	105
60 TCT TAT CAG ACC GTT TCC CGC GTG GTG AAC CAG GCG AGC CAC GTT TCT	1117	
Ser Tyr Gln Thr Val Ser Arg Val Val Asn Gln Ala Ser His Val Ser		
110	115	120

- 27 -

	GCG AAA ACG CGG GAA AAA GTG GAA GCG GCG ATG GCG GAG CTG AAT TAC Ala Lys Thr Arg Glu Lys Val Glu Ala Ala Met Ala Glu Leu Asn Tyr 125	130	135	1165
5	ATT CCC AAC CGC GTG GCA CAA CAA CTG GCG GGC AAA CAG TCG TTG CTG Ile Pro Asn Arg Val Ala Gln Gln Leu Ala Gly Lys Gln Ser Leu Leu 140	145	150	1213
10	ATT GGC GTT GCC ACC TCC AGT CTG GCC CTG CAC GCG CCG TCG CAA ATT Ile Gly Val Ala Thr Ser Ser Leu Ala Leu His Ala Pro Ser Gln Ile 155	160	165	1261
15	GTC GCG GCG ATT AAA TCT CGC GCC GAT CAA CTG GGT GCC AGC GTG GTG Val Ala Ala Ile Lys Ser Arg Ala Asp Gln Leu Gly Ala Ser Val Val 175	180	185	1309
20	GTG TCG ATG GTA GAA CGA AGC GGC GTC GAA GCC TGT AAA GCG GCG GTG Val Ser Met Val Glu Arg Ser Gly Val Glu Ala Cys Lys Ala Ala Val 190	195	200	1357
25	CAC AAT CTT CTC GCG CAA CGC GTC AGT GGG CTG ATC ATT AAC TAT CCG His Asn Leu Leu Ala Gln Arg Val Ser Gly Leu Ile Ile Asn Tyr Pro 205	210	215	1405
30	CTG GAT GAC CAG GAT GCC ATT GCT GTG GAA GCT GCC TGC ACT AAT GTT Leu Asp Asp Gln Asp Ala Ile Ala Val Glu Ala Ala Cys Thr Asn Val 220	225	230	1453
35	CCG GCG TTA TTT CTT GAT GTC TCT GAC CAG ACA CCC ATC AAC AGT ATT Pro Ala Leu Phe Leu Asp Val Ser Asp Gln Thr Pro Ile Asn Ser Ile 235	240	245	1501
40	ATT TTC TCC CAT GAA GAC GGT ACG CGA CTG GGC GTG GAG CAT CTG GTC Ile Phe Ser His Glu Asp Gly Thr Arg Leu Gly Val Glu His Leu Val 255	260	265	1549
45	GCA TTG GGT CAC CAG CAA ATC GCG CTG TTA GCG GGC CCA TTA AGT TCT Ala Leu Gly His Gln Gln Ile Ala Leu Leu Ala Gly Pro Leu Ser Ser 270	275	280	1597
50	GTC TCG GCG CGT CTG CGT CTG GCT GGC TGG CAT AAA TAT CTC ACT CGC Val Ser Ala Arg Leu Arg Leu Ala Gly Trp His Lys Tyr Leu Thr Arg 285	290	295	1645
55	AAT CAA ATT CAG CCG ATA GCG GAA CGG GAA GGC GAC TGG AGT GCC ATG Asn Gln Ile Gln Pro Ile Ala Glu Arg Glu Gly Asp Trp Ser Ala Met 300	305	310	1693
60	TCC GGT TTT CAA CAA ACC ATG CAA ATG CTG AAT GAG GGC ATC GTT CCC Ser Gly Phe Gln Gln Thr Met Gln Met Leu Asn Glu Gly Ile Val Pro 315	320	325	1741
65	ACT GCG ATG CTG GTT GCC AAC GAT CAG ATG GCG CTG GGC GCA ATG CGC Thr Ala Met Leu Val Ala Asn Asp Gln Met Ala Leu Gly Ala Met Arg 335	340	345	1789
70	GCC ATT ACC GAG TCC GGG CTG CGC GTT GGT GCG GAT ATC TCG GTA GTG Ala Ile Thr Glu Ser Gly Leu Arg Val Gly Ala Asp Ile Ser Val Val 350	355	360	1837
75	GGA TAC GAC GAT ACC GAA GAC AGC TCA TGT TAT ATC CCG CCG TCA ACC Gly Tyr Asp Asp Thr Glu Asp Ser Ser Cys Tyr Ile Pro Pro Ser Thr 365	370	375	1885
80	ACC ATC AAA CAG GAT TTT CGC CTG CTG GGG CAA ACC AGC GTG GAC CGC Thr Ile Lys Gln Asp Phe Arg Leu Leu Gly Gln Thr Ser Val Asp Arg 380	385	390	1933

- 28 -

TTG CTG CAA CTC TCT CAG GGC CAG GCG GTG AAG GGC AAT CAG CTG TTG Leu Leu Gln Leu Ser Gln Gly Gln Ala Val Lys Gly Asn Gln Leu Leu 395 400 405 410	1981
5 CCC GTC TCA CTG GTG AAA AGA AAA ACC ACC CTG GCG CCC AAT ACG CAA Pro Val Ser Leu Val Lys Arg Lys Thr Thr Leu Ala Pro Asn Thr Gln 415 420 425	2029
10 ACC GCC TCT CCC CGC GCG TTG GCC GAT TCA TTA ATG CAG CTG GCA CGA Thr Ala Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln Leu Ala Arg 430 435 440	2077
15 CAG GTT TCC CGA CTG GAA AGC GGG CAG TGAGCGAAC GCAATTAAATG Gln Val Ser Arg Leu Glu Ser Gly Gln 445 450	2124
20 TGAGTTAGCT CACTCATTAG GCACCCCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTC ACACAGGAAA CAGCTCTGCA GGCATGCAAG 20 CTTATCGAAT TCTCATTCAAG GCTTCTGCCG TTTTGGATTT AACCGAAGAT GATTCGATT TTCTGACGAG TAACAAAGTT TGGATTGCTA CTGACCGCTC TCGTGCTCGT CGCTGCGTTG	2184 2244 2304 2364
25 25 AGGCTTGCCT TT ATG GTA CGC TGG ACT TTG TGG GAT ACC CTC GCT TTC Met Val Arg Trp Thr Leu Trp Asp Thr Leu Ala Phe 1 5 10	2412
30 CTG CTC CTG TTG AGT TTA TTG CTG CCG TCA TTG CTT ATT ATG TTC ATC Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Pro Ser Leu Leu Ile Met Phe Ile 15 20 25	2460
35 CCG TCA ACA TTC AAA CGG CCT GTC TCA TCA TGG AAG GCG CTG AAT TTA Pro Ser Thr Phe Lys Arg Pro Val Ser Ser Trp Lys Ala Leu Asn Leu 30 35 40	2508
40 CGG AAA ACA TTA TTA ATG GCG TCG AGC GTC CGG TTA AAG CCG CTG AAT Arg Lys Thr Leu Leu Met Ala Ser Ser Val Arg Leu Lys Pro Leu Asn 45 50 55 60	2556
45 TGT TCG CGT TTA CCT TGC GTG TAC GCG CAG GAA ACA CTG ACG TTC TTA Cys Ser Arg Leu Pro Cys Val Tyr Ala Gln Glu Thr Leu Thr Phe Leu 65 70 75	2604
50 55 CTG ACG CAG AAG AAA ACG TGC GTC AAA AAT TAC GTG CAG AAG GAG Leu Thr Gln Lys Lys Thr Cys Val Lys Asn Tyr Val Gln Lys Glu 80 85 90	2649
55 TGATGTAATG TCTAAAGGTA AAAAACGTTG TGGCGCTCGC CCTGGTCGTC CGCAGCCGTT GCGAGGTACT AAAGGCAAGC GTAAAGGCAG TCGTCTTGG TATGTAGGTG GTCAACAATT TTAATTGCAAG GGGCTTCGGC CCTTACTTGA GGATAAATTG TGTCTAATAT TCAAACGGC	2709 2769 2829
55 GCCGA	2834

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

60

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 237 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

65

- 29 -

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

5	Met Ser Thr Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala	
	1	5 10 15
	Arg Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu	
	20 25 30	
10	Ser Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val	
	35 40 45	
15	Gly Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala	
	50 55 60	
	Leu Leu Thr Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser	
	65 70 75 80	
20	Ile Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Tyr Glu Ala Val Ser Met Gln Pro	
	85 90 95	
	Ser Leu Arg Ser Glu Tyr Glu Tyr Pro Val Phe Ser His Val Gln Ala	
	100 105 110	
25	Gly Met Phe Ser Pro Lys Leu Arg Thr Phe Thr Lys Gly Asp Ala Glu	
	115 120 125	
30	Arg Trp Val Ser Thr Thr Lys Lys Ala Ser Asp Ser Ala Phe Trp Leu	
	130 135 140	
	Glu Val Glu Gly Asn Ser Met Thr Ala Pro Thr Gly Ser Lys Pro Ser	
	145 150 155 160	
35	Phe Pro Asp Gly Met Leu Ile Leu Val Asp Pro Glu Gln Ala Val Glu	
	165 170 175	
	Pro Gly Asp Phe Cys Ile Ala Arg Leu Gly Gly Asp Glu Phe Thr Phe	
	180 185 190	
40	Lys Lys Leu Ile Arg Asp Ser Gly Gln Val Phe Leu Gln Pro Leu Asn	
	195 200 205	
45	Pro Gln Tyr Pro Met Ile Pro Cys Asn Glu Ser Cys Ser Val Val Gly	
	210 215 220	
	Lys Val Ile Ala Ser Gln Trp Pro Glu Glu Thr Phe Gly	
	225 230 235	

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 55 (A) LÄNGE: 360 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

60 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- 30 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

5 Val Lys Pro Val Thr Leu Tyr Asp Val Ala Glu Tyr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Tyr Gln Thr Val Ser Arg Val Val Asn Gln Ala Ser His Val Ser Ala
 20 25 30
 10 Lys Thr Arg Glu Lys Val Glu Ala Ala Met Ala Glu Leu Asn Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Asn Arg Val Ala Gln Gln Leu Ala Gly Lys Gln Ser Leu Leu Ile
 50 55 60
 15 Gly Val Ala Thr Ser Ser Leu Ala Leu His Ala Pro Ser Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Ala Ala Ile Lys Ser Arg Ala Asp Gln Leu Gly Ala Ser Val Val Val
 20 85 90 95
 Ser Met Val Glu Arg Ser Gly Val Glu Ala Cys Lys Ala Ala Val His
 100 105 110
 25 Asn Leu Leu Ala Gln Arg Val Ser Gly Leu Ile Ile Asn Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Asp Asp Gln Asp Ala Ile Ala Val Glu Ala Ala Cys Thr Asn Val Pro
 130 135 140
 30 Ala Leu Phe Leu Asp Val Ser Asp Gln Thr Pro Ile Asn Ser Ile Ile
 145 150 155 160
 Phe Ser His Glu Asp Gly Thr Arg Leu Gly Val Glu His Leu Val Ala
 35 165 170 175
 Leu Gly His Gln Gln Ile Ala Leu Leu Ala Gly Pro Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 40 Ser Ala Arg Leu Arg Leu Ala Gly Trp His Lys Tyr Leu Thr Arg Asn
 195 200 205
 Gln Ile Gln Pro Ile Ala Glu Arg Glu Gly Asp Trp Ser Ala Met Ser
 210 215 220
 45 Gly Phe Gln Gln Thr Met Gln Met Leu Asn Glu Gly Ile Val Pro Thr
 225 230 235 240
 Ala Met Leu Val Ala Asn Asp Gln Met Ala Leu Gly Ala Met Arg Ala
 50 245 250 255
 Ile Thr Glu Ser Gly Leu Arg Val Gly Ala Asp Ile Ser Val Val Gly
 260 265 270
 55 Tyr Asp Asp Thr Glu Asp Ser Ser Cys Tyr Ile Pro Pro Ser Thr Thr
 275 280 285
 Ile Lys Gln Asp Phe Arg Leu Leu Gly Gln Thr Ser Val Asp Arg Leu
 290 295 300
 60 Leu Gln Leu Ser Gln Gly Gln Ala Val Lys Gly Asn Gln Leu Leu Pro
 305 310 315 320
 Val Ser Leu Val Lys Arg Lys Thr Thr Leu Ala Pro Asn Thr Gln Thr
 65 325 330 335

- 31 -

Ala Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln Leu Ala Arg Gln
340 345 350

5 Val Ser Arg Leu Glu Ser Gly Gln
355 360

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

10

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 91 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Val Arg Trp Thr Leu Trp Asp Thr Leu Ala Phe Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

25

Ser Leu Leu Leu Pro Ser Leu Leu Ile Met Phe Ile Pro Ser Thr Phe
20 25 30

30

Lys Arg Pro Val Ser Ser Trp Lys Ala Leu Asn Leu Arg Lys Thr Leu
35 40 45

Leu Met Ala Ser Ser Val Arg Leu Lys Pro Leu Asn Cys Ser Arg Leu
50 55 60

35

Pro Cys Val Tyr Ala Gln Glu Thr Leu Thr Phe Leu Leu Thr Gln Lys
65 70 75 80

Lys Thr Cys Val Lys Asn Tyr Val Gln Lys Glu
85 90

40

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von mutierten O_R - oder O_L -Operator-DNA-Sequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
 - (a) eine DNA-Kassette herstellt, die ein Selektionsgen unter operativer Kontrolle einer Expressionskontrollsequenz, umfassend mindestens ein O_R - oder O_L -Operatorsequenz aus einem lambdoiden Phagen und einem Promotor enthält,
 - (b) die Operator-DNA-Sequenz einer Mutagenese unterzieht und
 - (c) die mutierten Operator-DNA-Sequenzen analysiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die lambdoiden Phagen ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Phage Lambda, Phage 21, Phage 22, Phage 82, Phage 424, Phage 434, Phage D326, Phage DLP12, Phage Gamma, Phage HK022, Phage P4, Phage Phi80, Phage Phi81, Coliphage 186 und rekombinanten Variationen davon.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Phage Lambda oder rekombinante Variationen davon verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die eine Operator-DNA-Sequenz aus den Operatorregionen O_R oder/und O_L des Phagen Lambda verwendet.

- 33 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Selektionsgen das E-Lysegen aus dem Phagen
PhiX174 verwendet.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Operator-DNA-Sequenz einer ortsspezifischen
Mutagenese durch Oligonukleotide unterzieht oder eine
10 Selektion in einem Mutator-Bakterienstamm durchführt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Analyse der mutierten Operator-DNA-Sequenzen
15 durch Bestimmung der Bindefähigkeit mit einem tempera-
tursensitiven cI-Repressor erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß man den temperatursensitiven Lambda-Repressor cI857
verwendet.
9. Mutierte O_R- oder O_L-Operatorsequenzen aus lambdoiden
Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unter-
25 schiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung
eines Repressors aufweisen, erhältlich durch ein Verfah-
ren nach einem der Ansprüche 1 - 8.
10. Mutierte O_R- oder O_L-Operatorsequenzen aus lambdoiden
Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz erhöhte
Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines tempera-
tursensitiven Repressors aufweisen, erhältlich durch ein
Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8.
- 35 11. Mutierte O_R- oder O_L-Operatorsequenz nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine um etwa 3 - 10°C erhöhte Thermostabilität

aufweist.

12. Mutierte O_R - oder O_L -Operatorsequenz nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß sie eine um etwa 7 - 9°C erhöhte Thermostabilität
aufweist.
13. Mutierte Lambda- O_R - oder O_L -Operatorsequenz nach einem
der Ansprüche 9 - 12, die eine Variante der in SEQ ID
10 NO. 1 oder SEQ ID NO. 3 gezeigten Sequenzen ist.
14. Mutierte Lambda- O_R -Operatorsequenz, umfassend die in SEQ
ID NO. 2 gezeigte Sequenz.
15. 15. Verwendung einer mutierten O_R - oder O_L -Operatcrsequenz
nach einem der Ansprüche 9 - 14 zur temperaturregulier-
ten Expression von Genen in Bakterienzellen.
16. Verwendung einer Kombination von (a) einer Wildtyp- O_R -
20 oder O_L -Operatorregion und mindestens einer Operatorre-
gion, die eine mutierte O_R - oder O_L -Operatorsequenz nach
einem der Ansprüche 9 - 14 enthält, oder (b) mehreren
Operatorregionen, die mutierte O_R - oder O_L -Operatorse-
quenzen nach einem der Ansprüche 9 - 14 enthalten, mit
25 unterschiedlicher Thermostabilität zur temperaturregu-
lierten sequentiellen Expression von Genen.
17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß die Bakterienzellen zur Regulation der Genexpression
ein Gen für einen cI-Repressor aus lambdoiden Phagen
enthalten.
18. Verwendung nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
35 daß die Bakterienzellen das Gen für den Lambda-cI857-
Repressor enthalten.

- 35 -

19. Nucleinsäure, umfassend eine bakterielle Expressionskontrollsequenz, die eine mutierte O_R- oder O_L-Operatorsequenz nach einem der Ansprüche 9 - 14 enthält, in operativer Verknüpfung mit einer Protein-codierenden Sequenz.
5
20. Nucleinsäure nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Protein-codierende Sequenz ein Suizidgen ist.
- 10 21. Nucleinsäure nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Expressionskontrollsequenz einen Lambda-P_L- oder P_R-Promotor enthält.
- 15 22. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 19 - 21 enthält.
- 20 23. Vektor nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein bakterieller chromosomaler Vektor ist.
24. Vektor nach Anspruch 22,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
daß er ein bakterielles extrachromosomal Plasmid ist.
25. Bakterienzelle,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß sie mit einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 19 - 21 oder einem Vektor nach einem der Ansprüche 22 - 24 transformiert ist.
26. Bakterienzelle nach Anspruch 25,
35 **dadurch gekennzeichnet,**
daß sie die Nucleinsäure oder den Vektor in ihrem Chromosom integriert enthält.

- 36 -

27. Bakterienzelle nach Anspruch 25 oder 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin ein Gen für einen cI-Repressor aus
lambdaoiden Phagen enthält.

5

28. Bakterienzelle nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie das Gen für den Lambda cI857 Repressor enthält.

10 29. Impfstoffzusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine lebende Bakterienzelle nach einem der An-
sprüche 26 - 28 als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharma-
zeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen
15 enthält.

20 30. Impfstoffzusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Bakterienghost als Wirkstoff gegebenen-
falls mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz-
und Trägerstoffen enthält, wobei der Bakterienghost
durch Kultivierung einer Bakterienzelle nach einem der
Ansprüche 25 - 28 bei Temperaturen von 35 - 39°C und an-
schließende Lyse der Bakterienzelle durch Temperaturer-
höhung erhältlich ist.

25 31. Nucleinsäure, umfassend (a) eine erste bakterielle Ex-
pressionskontrollsequenz, die eine O_R- oder O_L -Opera-
torsequenz aus einem lambdaoiden Phagen enthält und an
die ein erster cI Repressor aus lambdaoiden Phagen binden
kann, in operativer Verknüpfung mit einer für einen
zweiten Repressor kodierenden Sequenz, wobei der zweite
Repressor nicht an die erste bakterielle Expressionsse-
quenz binden kann, und (b) eine zweite bakterielle Ex-
pressionskontrollsequenz, an die der zweite Repressor
binden kann, in operativer Verknüpfung mit einem Suizid-
gen.

- 37 -

32. Bakterienzelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach
Anspruch 31 enthält.

5

33. Bakterienzelle nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin ein Gen für den ersten Repressor ent-
hält.

10

34. Bakterienzelle nach Anspruch 32 oder 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste bakterielle Expressionskontrollsequenz
eine mutierte Operatorsequenz nach einem der Ansprüche 9
15 - 14 enthält.

20

35. Bakterienzelle nach einem der Ansprüche 32 - 34, weiter-
hin umfassend (c) eine dritte bakterielle Expressions-
kontrollsequenz, die eine mutierte Operatorsequenz nach
einem der Ansprüche 9 - 14 enthält, in operativer Ver-
knüpfung mit einem Suizidgen.

25

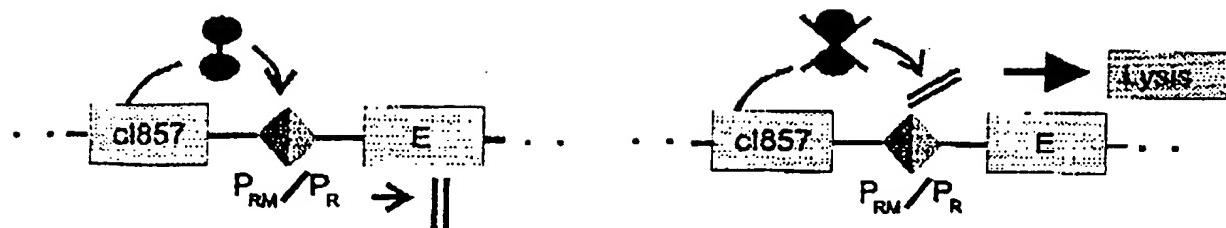
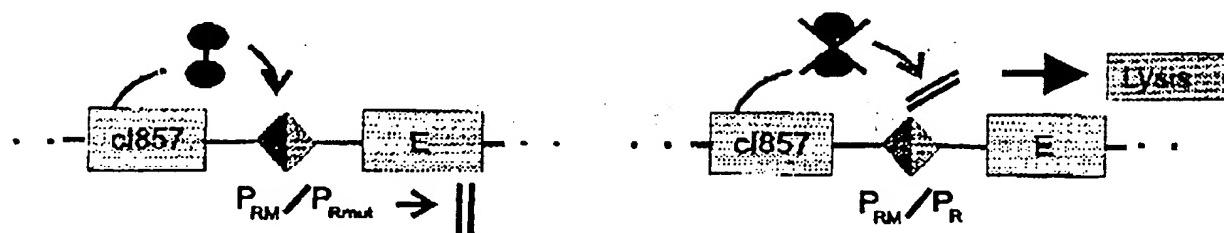
36. Impfstoffzusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine lebende Bakterienzelle nach einem der An-
sprüche 32 - 35 als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharma-
zeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen
enthält.

30

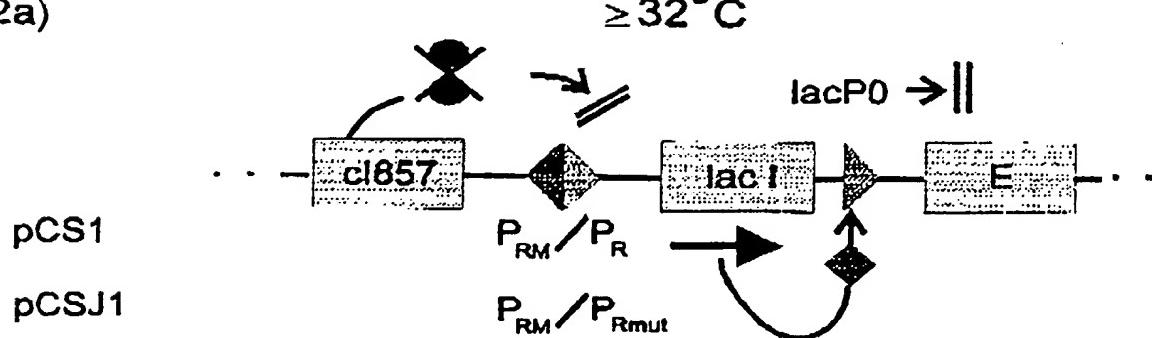
37. Verwendung von Impfstoffzusammensetzungen nach Anspruch
29 oder 36 als wärme- oder/und kälteempfindliche Sicher-
heitslebendvakzine.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

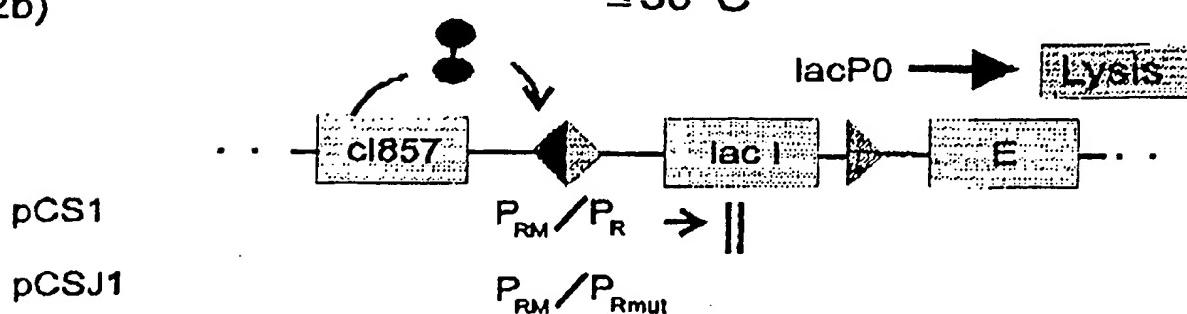
1/5

1a) μ AW12 $\leq 30^\circ\text{C}$  $\geq 30^\circ\text{C}$ b) pAWJ12 $\leq 37^\circ\text{C}$  $\geq 39^\circ\text{C}$

2a)

 $\geq 32^\circ\text{C}$

2b)

 $\leq 30^\circ\text{C}$

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 5

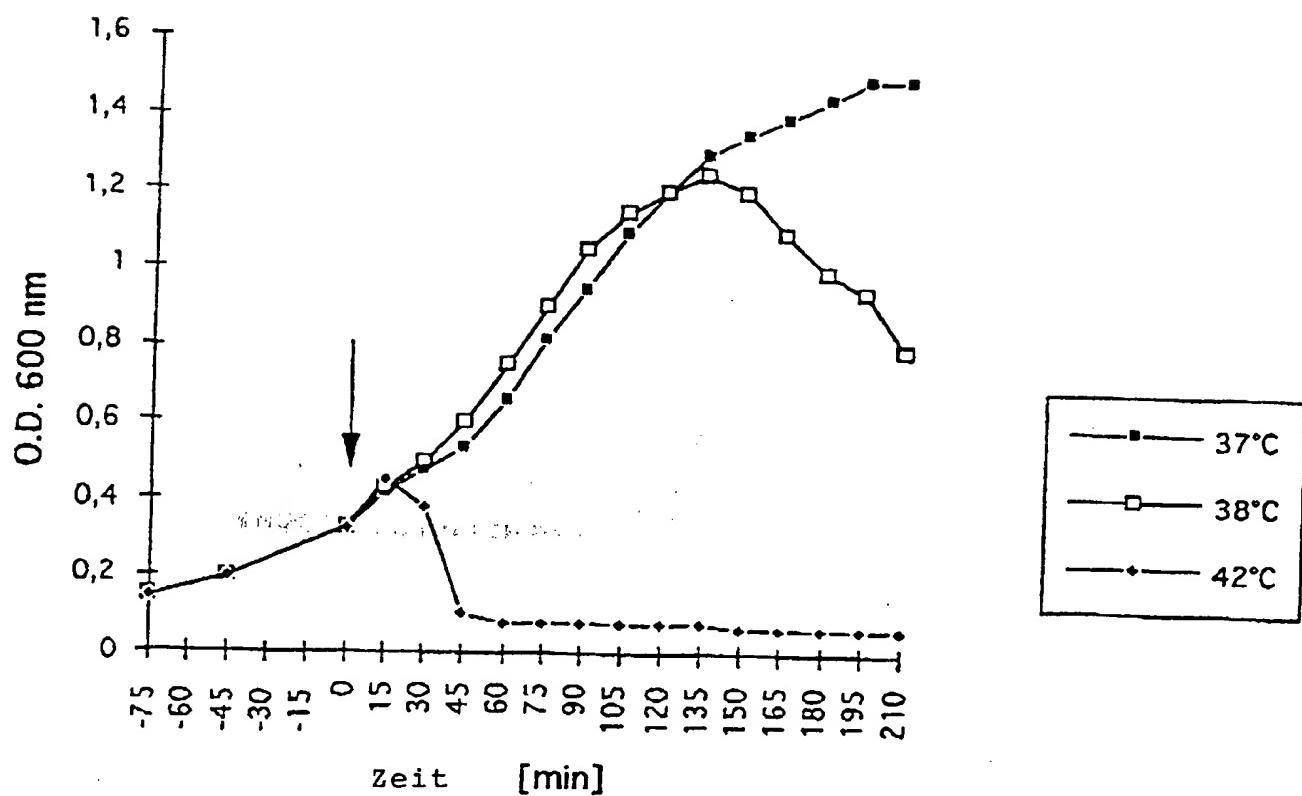


Fig. 3: Wachstum von *E.coli* NM522(pAWJ12) bei Temperaturänderung von 28°C auf höhere Temperaturen (↓)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

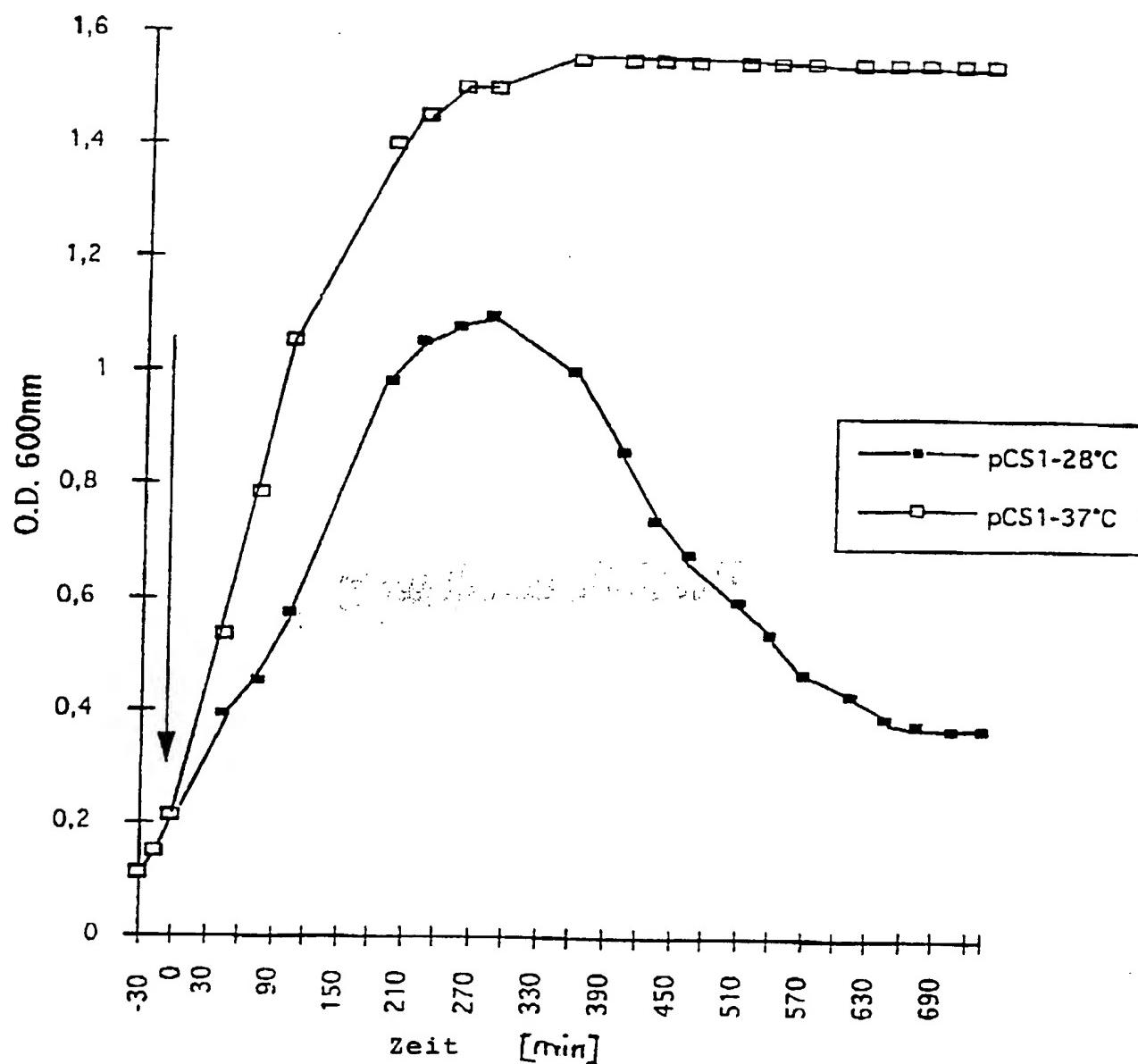


Fig. 4: Wachstum von *E.coli* MC4100(pCS1) bei Temperaturänderung von 37°C auf 28°C (↓)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

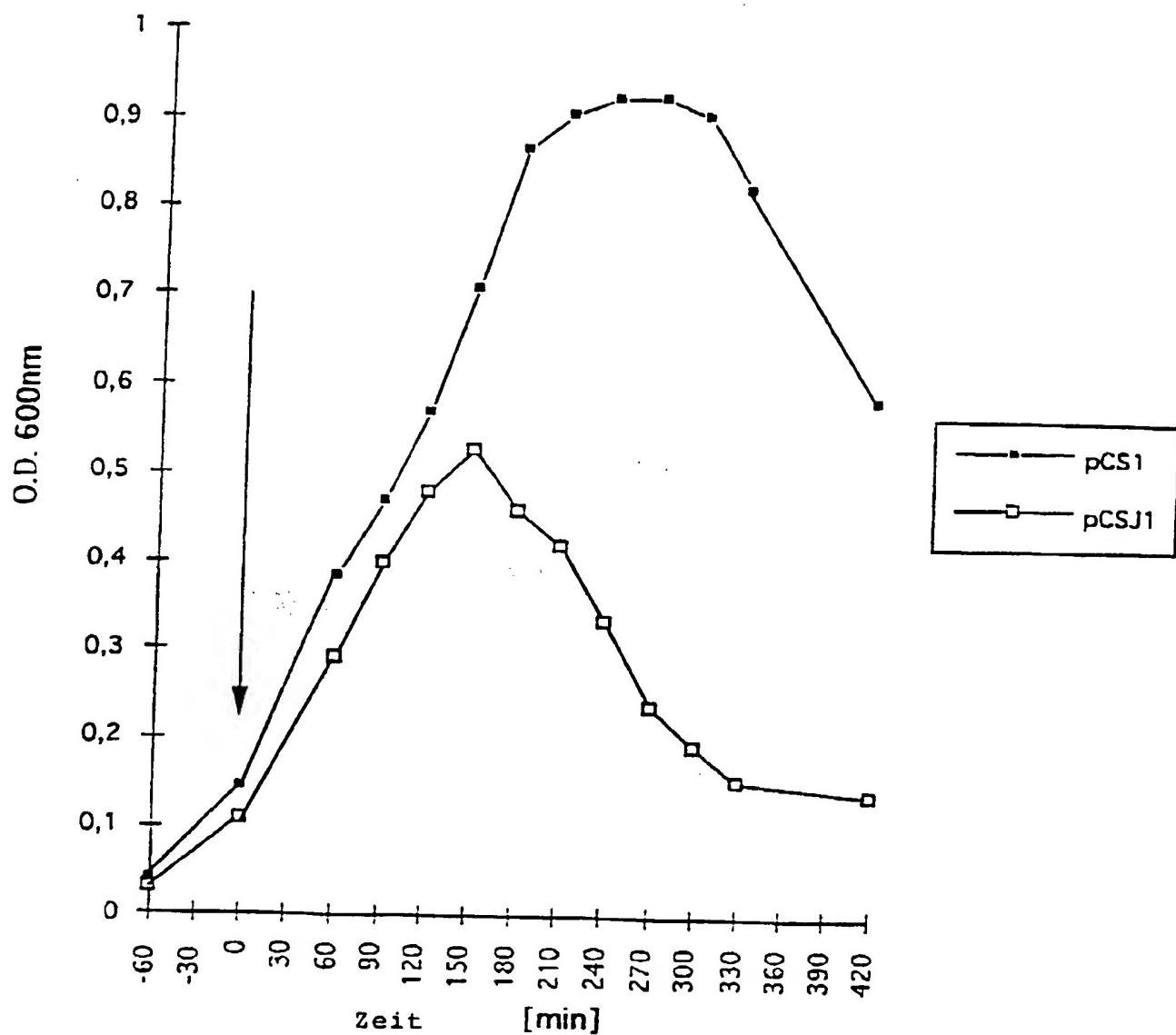


Fig. 5: Wachstum von E.coli MC4100(pCS1) und MC4100(pCSJ1) bei Temperaturänderung von 37°C auf 28°C (↓)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 6a

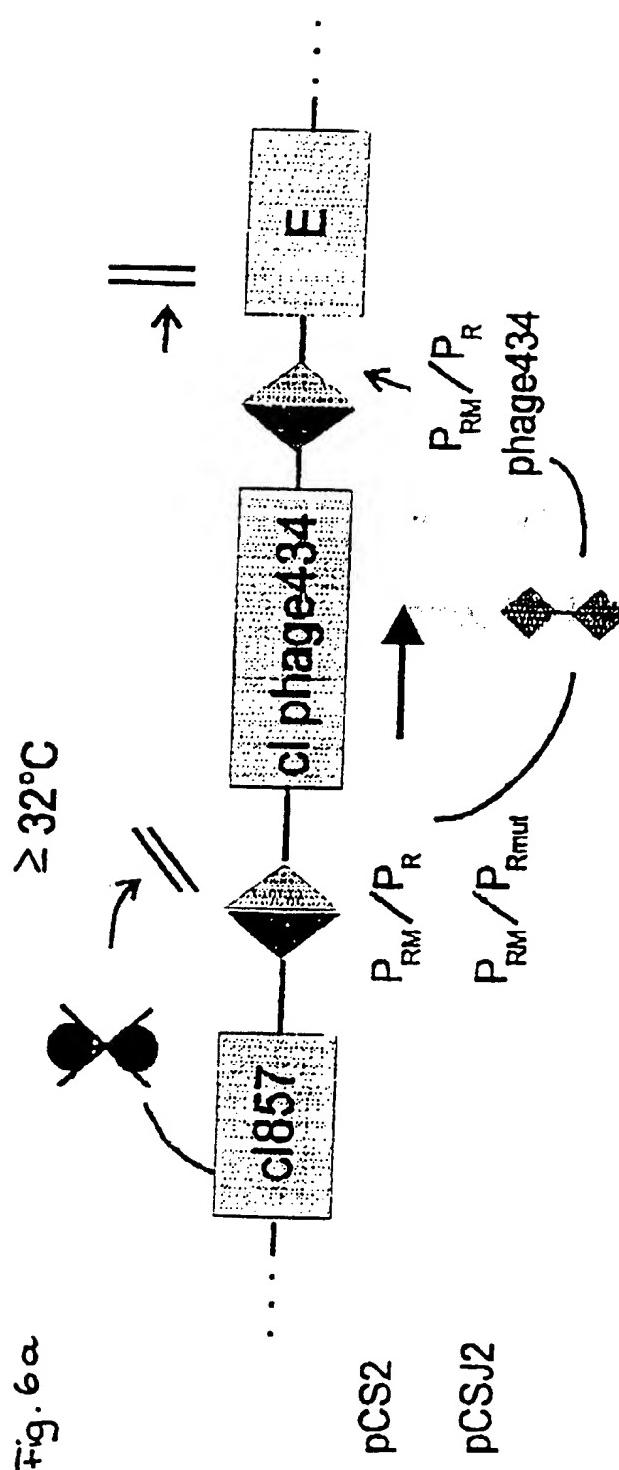
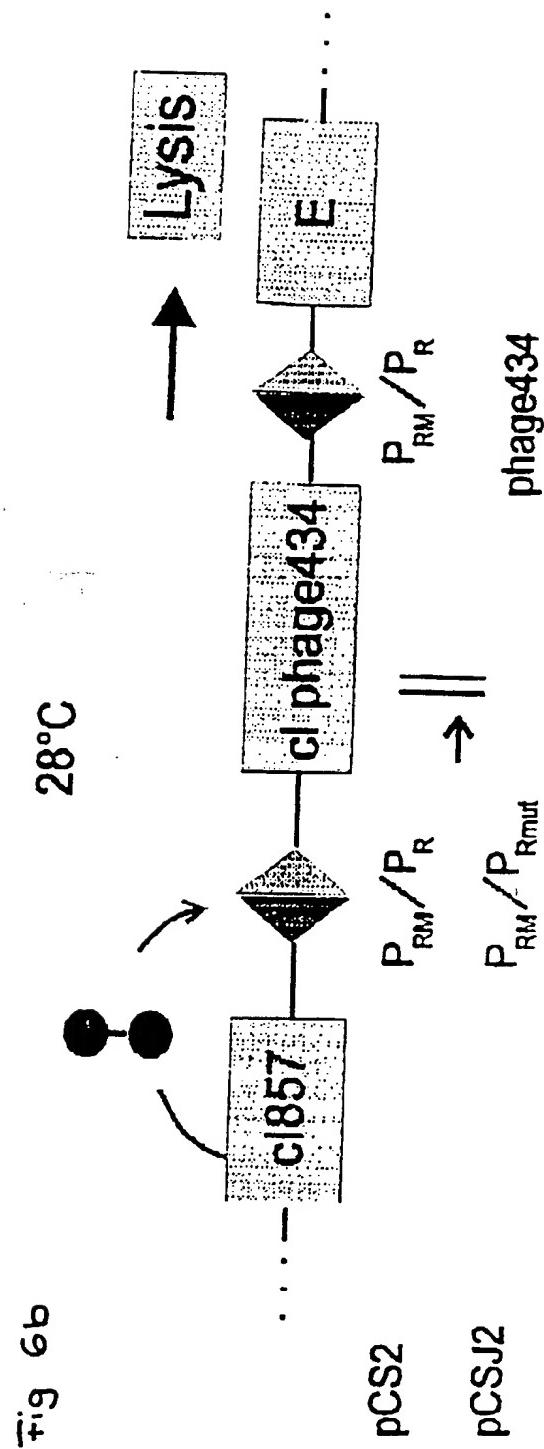


Fig. 6b



THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/73, 15/10, A61K 39/02 // C 12N 9/36		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/07874
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Februar 1998 (26.02.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04560		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. August 1997 (21.08.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 33 698.8 21. August 1996 (21.08.96) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: LUBITZ, Werner [AT/AT]; Schönborngasse 12/7, A-1080 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JECHLINGER, Wolfgang [AT/AT]; Strozzigasse 38/12, A-1080 Wien (AT). SZOSTAK, Michael [AT/AT]; In den Schnablern 9/3, A-2344 Maria Enzersdorf (AT).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 26. März 1998 (26.03.98)	
(54) Title: NEW SYSTEMS FOR REGULATING GENETIC EXPRESSION			
(54) Bezeichnung: NEUE SYSTEME ZUR REGULATION DER GENEXPRESSION			
(57) Abstract			
<p>The present invention concerns a process for selecting new P_R- or P_L-operator sequences of lambdoid phages which, compared to wild-type sequences, have a different thermostability for the binding of a repressor. In addition, the invention discloses new mutated P_R- or P_L-operator sequences and their use for temperature-regulated expression of genes and for producing improved vaccines.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion neuer P_R- oder P_L-Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen. Weiterhin werden neue mutierte P_R- oder P_L-Operatorsequenzen sowie deren Verwendung zur temperaturregulierten Expression von Genen und zur Herstellung verbesserter Impfstoffe offenbart.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 97/04560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/73 C12N15/10 A61K39/02 //C12N9/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HERSHBERGER P.A.: "Interference by PR-bound RNA polymerase with PRM function in vitro." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 12, 25 April 1993, pages 8943-8948, XP002052321 see abstract; figure 1 see page 8943, paragraph 5 ---	1-4, 6
Y	WO 91 13155 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 5 September 1991 see abstract; figures 1,2; examples 10-12 see page 3 - page 5 see page 10 - page 11 ---	5
Y	WO 91 13155 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 5 September 1991 see abstract; figures 1,2; examples 10-12 see page 3 - page 5 see page 10 - page 11 ---	5
A	---	16-33
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

20 January 1998

11.02.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	al Application No
PCT/EP 97/04560	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KUNKEL T. A.: "RAPID AND EFFICIENT SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS WITHOUT PHENOTYPIC SELECTION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 82, January 1985, pages 488-492, XP002052322 cited in the application see abstract; tables 2,3 see page 489, paragraph 3 - page 491, paragraph 1 ---	6
A	SZOSTAK M P ET AL: "Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 January 1996, page 161-170 XP004036862 see page 162, paragraph 5 - page 163, paragraph 2; figures 2,3,5; table 1 -----	5,19-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP 97/04560**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/04560

Note: although claim 37 refers to a treatment procedure to be applied to a human/animal body,
the search was made based on the given effects of the compound concerned.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal ref Application No

PCT/EP 97/04560

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9113155 A	05-09-91	DE 4005874 A AU 7237391 A DE 59101580 D EP 0516655 A IE 64613 B JP 5503014 T US 5470573 A	07-11-91 18-09-91 09-06-94 09-12-92 23-08-95 27-05-93 28-11-95

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internr. als Aktenzeichen
PCT/EP 97/04560

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/73 C12N15/10 A61K39/02 //C12N9/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationsystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HERSHBERGER P.A.: "Interference by PR-bound RNA polymerase with PRM function in vitro." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 268, Nr. 12, 25.April 1993, Seiten 8943-8948, XP002052321 siehe Zusammenfassung; Abbildung 1 siehe Seite 8943, Absatz 5 ---	1-4,6
Y	WO 91 13155 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 5.September 1991 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 1,2; Beispiele 10-12 siehe Seite 3 - Seite 5 siehe Seite 10 - Seite 11 ---	5
Y		5
A		16-33
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20.Januar 1998

11.02.98

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internaz. Aktenzeichen

PCT/EP 97/04560

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KUNKEL T. A.: "RAPID AND EFFICIENT SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS WITHOUT PHENOTYPIC SELECTION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, Bd. 82, Januar 1985, Seiten 488-492, XP002052322 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung; Tabellen 2,3 siehe Seite 489, Absatz 3 - Seite 491, Absatz 1 ---	6
A	SZOSTAK M P ET AL: "Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 44, Nr. 1, 26.Januar 1996, Seite 161-170 XP004036862 siehe Seite 162, Absatz 5 - Seite 163, Absatz 2; Abbildungen 2,3,5; Tabelle 1 -----	5,19-33

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/04560

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl der Anspruch 37 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat'les Aktenzeichen

PCT/EP 97/04560

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9113155 A	05-09-91	DE 4005874 A AU 7237391 A DE 59101580 D EP 0516655 A IE 64613 B JP 5503014 T US 5470573 A	07-11-91 18-09-91 09-06-94 09-12-92 23-08-95 27-05-93 28-11-95

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(51) Internationale Patentklassifikation 6: C12N 15/73, 15/10, A61K 39/02 // C 12N 9/36		FIRST: A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/07874
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Februar 1998 (26.02.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04560		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. August 1997 (21.08.97)		(82) Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 33 698.8 21. August 1996 (21.08.96) DE		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 26. März 1998 (26.03.98)	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: LUBITZ, Werner [AT/AT]; Schönborngasse 12/7, A-1080 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JECHLINGER, Wolfgang [AT/AT]; Strozzigasse 38/12, A-1080 Wien (AT). SZOSTAK, Michael [AT/AT]; In den Schnablern 9/3, A-2344 Maria Enzersdorf (AT).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

(54) Title: NEW SYSTEMS FOR REGULATING GENETIC EXPRESSION

(54) Bezeichnung: NEUE SYSTEME ZUR REGULATION DER GENEXPRESSSION

(57) Abstract

The present invention concerns a process for selecting new PR- or PL-operator sequences of lambdoid phages which, compared to wild-type sequences, have a different thermostability for the binding of a repressor. In addition, the invention discloses new mutated PR- or PL- operator sequences and their use for temperature-regulated expression of genes and for producing improved vaccines.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion neuer PR- oder PL-Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen. Weiterhin werden neue mutierte PR- oder PL-Operatorsequenzen sowie deren Verwendung zur temperaturregulierten Expression von Genen und zur Herstellung verbesserter Impfstoffe offenbart.

THIS PAGE BLANK (USPTO)